嗜酸菌耐酸 pH 平衡机制及潜在应用*

张月明　乔建军**

（天津大学化工学院制药工程系 系统生物工程教育部重点实验室 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072）

摘要：嗜酸菌是一类可以在极端酸性环境下生存的微生物，在生物整治以及耐热耐酸酶的提取等领域发挥着重要作用。一些嗜中性工程菌株在发酵过程中经常遇到自身环境酸化的问题，嗜酸菌独特的耐酸能力及其耐酸模块为构建耐酸能力强的嗜中性工程菌株提供了思路。因此，从细胞膜的稳定性及低渗透性，耐酸相关的能量代谢，生物大分子的修复以及胞内缓冲作用等方面对嗜酸菌的耐酸机制进行深入探讨，并展望了嗜酸菌在耐酸工程菌株合成生物学邻域的作用。

关键词：嗜酸菌　耐酸模块　pH 平衡机制　合成生物学

嗜酸菌是生活在极端酸性环境中的一个重要的微生物类群，在人们的生产生活中发挥着巨大的作用。大多数嗜酸菌生长在 pH2-3，甚至 pH 接近 1 的酸性环境中，比如酸性矿山排水，火山湖以及地热泉等。嗜酸菌广泛分布在细菌和古细菌域，在重金属污染土壤的生物整治、生物湿法冶金以及耐热耐酸酶的提取等领域有着重要的应用价值[1]。嗜酸菌中在高温和酸性条件下保持活性的酶，在果汁等食品工业中发挥着极为重要的作用。随着基因工程以及定向进化技术的发展，这些耐热耐酸酶的工业化生产和应用也逐渐成为现实[2]。

微生物体内环境的酸化会破坏细胞质内生物大分子的结构，所以其胞内环境 pH 一般接近中性。相比多数胞内 pH 保持在 7.0 左右的嗜中性微生物而言，嗜酸菌胞内 pH 会有所变化。已知的嗜酸古细菌中，*Picrophilus oshimae* 的胞内 pH 可低至 4.6。这应该是细胞质 pH 的下限，如果继续降低，胞内大分子的稳定性就会受到影响。

在对中性微生物的酸胁迫研究中，发现了谷氨酸脱羧酶系统（GAD）、大分子保护以及氨的生成等耐酸机制[3]。随着计算生物学，合成生物学的发展，很多学者通过计算机设计基因回路，建立人工细胞模型模拟微生物代谢，进行生物学的研究和探索[4-5]。已有很多研究运用合成生物学的方法，设计不同的耐酸模块整合到工业菌株中，用于生产醋酸、乳酸等原料或降解多环芳香烃 PAHs 等环境有害物质[6]。相比工程菌株和肠道益生菌等中性耐酸微生物，嗜酸菌具有更强的耐酸能力。因此，利用生物信息学以及合成生物学的方法，从嗜酸菌中获取特定耐酸模块，通过人工设计耐酸代谢网络，可以构建耐酸能力更强的工业菌株。所以本文在前人研究的基础上，对嗜酸菌的耐酸机制研究进展进行介绍，为合成耐酸工程菌株提供理论依据与实践指导。

* 国家自然科学基金资助项目（31570089）

**通讯作者，电子邮箱：jianjunq@tju.edu.cn

1 细胞质的酸化及影响

细胞质的酸化是由于过多的质子摄入导致的，那么质子是如何通过细胞膜，从而引起细胞质的酸化？首先，外膜并不能有效抑制质子的移动。外膜没有内膜致密，孔径较大，易于质子渗透。所以细胞周质一般随外环境 pH 的降低而酸化，不能起到质子缓冲的作用。内膜是抑制质子进入的主要壁垒。尽管一些小的疏水分子可以通过扩散穿过膜，但是亲水的带电荷分子不能通过，而必须经过特殊的运输过程。因为带电荷，所以像 H^+那么小的物质也不能扩散穿过细胞膜。质子在水溶液中可能以 H_3O^+的形式存在，但是水通道蛋白只对水分子具有选择性而不是 H_3O^+，所以带电荷离子会被阻止不能穿过孔道，同时一些小的离子或质子也会被阻止通过。质子在酸性固体培养基中不是简单的以游离的 H^+或者 H_3O^+存在，所以在固体培养基中质子通过膜的机制比较复杂[7]。质子同样可以借助转运蛋白，比如 Na^+/H^+反向转运蛋白或者破损的细胞膜进入细胞质中。一些分子以非极性分子的形式通过内膜，随后在细胞质中降解分离。弱有机酸在溶液中基本以非极性的形式存在，可以结合外部的质子，并将质子带入胞质中，降低细胞内外的 pH 梯度，从而严重妨碍细胞质 pH 恢复[8]。解偶联剂，如二硝基苯酚和双香豆素等脂溶性物质，可以增加膜通透性，从而加速质子的跨膜渗透，导致细胞质酸化。

细胞质酸化会破坏膜的结构，降低胞内酶的活性，诱导蛋白解折叠以及引起 DNA 损伤。Feng 等[9]发现嗜酸氧化硫硫杆菌 ZJJN-3（*Acidithiobacillus thiooxidans* ZJJN-3）的细胞形态随外界 pH 的变化而改变。在胞外 pH 为 0.8 时，*At. thiooxidans* ZJJN-3 的细胞形态比 pH1.2 短而粗。这表明外环境 pH 的变化可能改变嗜酸菌细胞膜的物理结构。Feyhl-Buska 等[10]发现 *Picrophilus torridus* 的膜组成 GDGTs 丰度随着培养基 pH 升高而减少，说明 pH 影响嗜酸古细菌细胞膜中四醚脂质的组成。pH 环境的改变会导致蛋白质结构与功能地剧烈改变。由于可溶性蛋白质的表面主要由极性氨基酸侧链组成，其中大多都是离子化的，因此蛋白质的静电荷和整个表面电荷的分布，都会随着 pH 的改变而调整，从而间接影响蛋白质的生物化学功能[11]。同时，胞外环境酸化也会改变溶液中分子的电离状态，不利于营养物质被微生物有效利用。

2 嗜酸菌的耐酸机制

虽然嗜酸菌生活在极端酸性环境里，但其体内 pH 却是近中性的。那么嗜酸菌如何在极端酸性环境下生存？在对其耐酸机制不断的研究的过程中，我们可以发现，其耐酸系统主要包括以下几个方面：即细胞膜的稳定性，有效地质子抑制及泵出，DNA 及蛋白质的修复和适宜的胞内缓冲作用等。嗜酸菌的细胞膜对酸具有稳定性。许多的嗜酸菌依赖于细胞膜的流动性和选择透过性来维持细胞内外 pH 梯度，并通过改变细胞膜中特定的组成成分的比例起到一定的耐酸作用。嗜

酸菌独特的跨膜电位差Δψ可以有效抑制质子流入胞质，并通过合成更多的 H^+-ATPase 泵出质子。相比中性菌，嗜酸菌中的酶和蛋白质更具有耐酸性，并且这些大分子在酸性条件下能起到最佳的作用。胞内缓冲作用可以应对小幅度的 pH 变化，如果外部 pH 进一步降低时，则合成分子伴侣，如酸休克蛋白和热休克蛋白可能用于防止胞内蛋白质的酸变性或帮助变性蛋白质进行再折叠。图 1 简要总结了嗜酸菌在极端酸性条件下胞内外 pH 平衡机制。

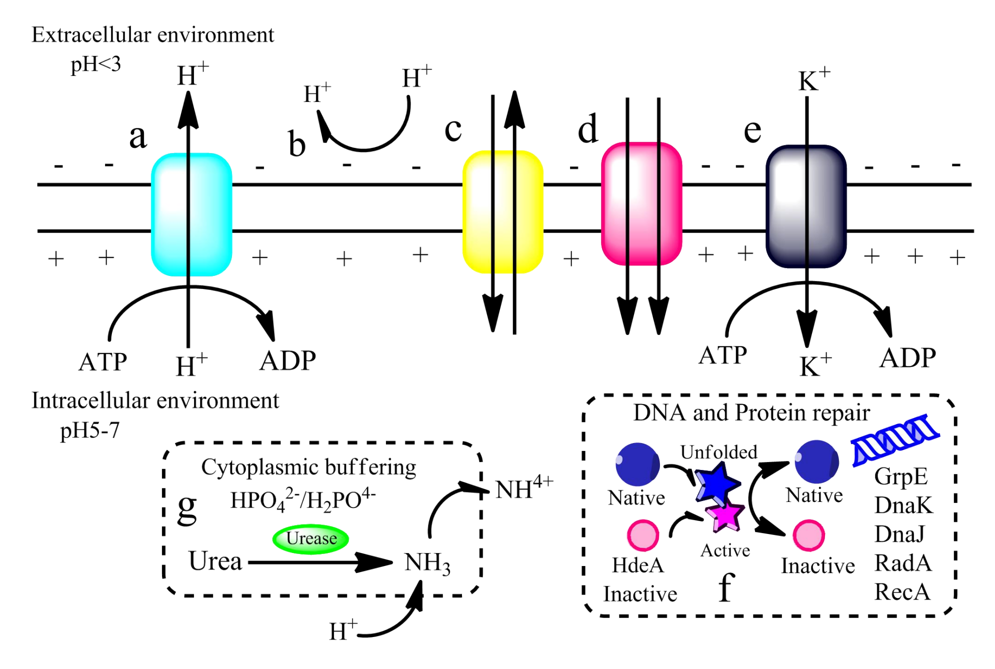


图 1　嗜酸菌耐酸 pH 平衡机制（改自文献[2]和[6]）

（a）H^+-ATPase 泵出多余的 H^+　（b）细胞膜的稳定性和低渗透性有效抑制 H^+流入胞内　（c-d）丰富的二次转运蛋白可以降低嗜酸菌耐酸代谢能量的需求　（e）K^+-ATPases 产生逆膜电位　（f）DNA 和蛋白质修复系统　（g）细胞质的缓冲作用

Fig.1 Mechanism of acid tolerance in acidophiles with pH homeostasis

(a) Efflux of H+ through H^+-ATPase　(b) Highly stable and impermeable cell membranes that retard the influx of H^+　(c-d) Abundant secondary transporters that reduce the energy demands associated with the transportation of nutrients and contribute to the pH homeostasis　(e) K^+-ATPases that generate a reversed Δψ with increasing the positive potential inside the cell membrane　(f) DNA and protein repair systems　(g) Cytoplasmic buffering that maintain the intracellular pH

2.1 细胞膜的稳定性及表面修饰

脂类是所有细胞膜的重要组成成分，其结构随不同生命领域的变化而改变。细菌和真核生物的脂质是脂肪酸和甘油分子间的酯键连接，而古细菌的脂质是甘油和其疏水侧链间的醚键连接。古细菌的细胞膜是脂单分子层，而细菌和真核生物的细胞膜是脂质双分子层。醚键比酯键具有更强的酸耐受性，同时单分子层膜对质子高度不渗透且在极端酸性环境具有更高的稳定性[12]。

嗜酸菌保持其内部 pH 稳定的一个重要途径就是细胞膜对 H^+的低渗透性。嗜酸菌的细胞质膜对质子具有高度地低渗透性，所以质子不易进入到细胞质中。大量的研究结果表明，支持嗜酸菌抑制 H^+作用的主要是细胞膜上的脂类物质。研究发现 *P. oshimae* 细胞膜上含有的脂质体在 pH 3.0-4.0 范围内的酸性环境中可以迅速的形成规则的囊泡状结构，但是在中性环境中就不能形成这一结构。同时，这种囊泡状结构有着极低的 H^+渗透性。当环境 pH 变化到 7.0 左右时，这一结构

又会发生变化形成不规则结构[13]。这说明嗜酸菌在适应酸性环境的同时，进行自身细胞膜结构的完善，从而保证细胞膜的稳定性。Mangold S 等[14]在低 pH 地条件下对喜温嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus caldus*）蛋白质组学研究发现其细胞膜中脂肪酸组成的变化可以增加膜的刚性。细胞膜通过上调不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸的比例维持胞内环境的稳定。

当外界环境变为中性时，专性嗜酸菌的细胞质膜就会溶解，这表明专性嗜酸菌细胞膜的稳定性需要高浓度的 H^+维持。当目前已知最为嗜酸的原核生物是 *P. oshimae* 和 *P. torridus*，它们的最适生长 pH 为 0.7。当 pH 高于 4 的时候，*P. oshimae* 和 *P. torridus* 细胞膜变得渗漏且不完整，从而导致细胞膜结构缺失。通过研究嗜酸菌属的细胞膜，发现其类脂的排列很不寻常，能形成一种在最适 pH 下不被强酸透过的膜。在极端的酸性环境中，这一细胞膜表现出超强的酸稳定性和极低的质子透过性[15]。在无细胞壁的条件下，热原体属（*Thermoplasma*）为适应极低 pH 等极端环境，进化出一种独特的细胞膜结构，使得热原体属微生物可以在酸性环境下生存[16]。Shimada 等[17]研究 pH 对嗜酸热原体（*Thermoplasma acidophilum*）细胞膜糖脂的糖水化合物的构建的影响，发现 pH 降低会增加膜的表面面积，这对于糖的羟基修饰有很大的作用。作者推测与细胞膜有关的糖基修饰在嗜酸菌耐受外部极端酸性方面有作用。在 Mykytczuk 等[18]研究中，发现影响嗜酸氧化亚铁硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）生长和生存的主要因素是细胞膜的流动性，在外界环境 pH 为 1.5 时，其细胞膜能够有效的保持其稳定性。研究结果表明，在 *At. ferrooxidans* 所处的环境 pH 发生变化时，它可以通过改变自身脂肪酸的组成来改变整个细胞膜的流动性和相位，以应对外界发生的变化。在其最适生长 pH 的环境下，增加细胞内外的 pH 梯度差可以降低细胞膜的流动活性，从而改变了 H^+的通透性，以维持其渗透屏障。Tyson 等[19]通过 AMD 生物膜的鸟枪测序，发现嗜铁钩端螺旋菌（*Leptospirillum ferriphilum*）含有许多细胞膜生物合成基因。作者推测丰富的细胞膜合成基因在 *L. ferriphilum* 耐酸方面可能起到重要的作用。

2.2 与耐酸有关的能量代谢

嗜酸菌能在酸性条件下生长繁殖，需要产生大量代谢能量来维持胞内外的 pH 梯度，并保持胞内 pH 的稳定[20]。尽管 H^+和 OH^-都是小分子，但因为都带电荷，所以都不可以自由地通过细胞膜，也不可能重新在膜内外自发达到平衡，净积累的结果是在跨膜的两侧生成 pH 梯度和电势能。膜的这种能量状态称为质子动力 PMF，负责驱动细胞中许多需要能量的功能，包括某些物质的运输方式和细胞能量 ATP 的生物合成。质子动力 PMF 对嗜酸菌在极端酸性下生存有重要作用。由于 *At. ferrooxidans* 的细胞周质 pH 在 1-2 之间，而细胞质的 pH 维持在 5.5-6 之间，这就造成了较大的天然跨膜质子梯度。只要 *At. ferrooxidans* 具有可供使用

的 Fe^{2+}，它就会利用跨细胞质膜的质子动力进行 ATP 的合成。但是亚铁氧化为高价铁时产生的能量很少，所以为了生长，*At. ferrooxidans* 需要在酸性环境下氧化足够的亚铁获得能量[21]。在人工质子梯度存在的条件下，*At. caldus* 氧化还原态无机硫化物时，质子梯度驱动了与膜结合的 F_1-F_0-ATPase 合成 ATP[22]。

为了保持胞内外 pH 平衡，嗜酸菌通过质子泵将多余的质子泵出细胞质外。Quatrini 等[23]对 *At. ferrooxidans* 、*At. thiooxidans* 和 *At. caldus* 基因组进行序列分析，发现了一些可能的质子泵出系统。Feng 等[9]发现外部环境 pH 为 0.8 时，*At. thiooxidans*ZJJN-3 膜上 H^+-ATPase 的活性比 pH 为 1.2 时增加 28.5%，这说明环境酸化促使 *At. thiooxidans*ZJJN-3 合成更多的 H^+-ATPase 泵出质子。

高的 pH 梯度和反电动势是嗜酸菌的典型生物能学特性。质子流入胞内同样受到道南电势产生的化学渗透梯度抑制。在 *P. torridus*[24]和 *S. solfataricus* P2[25]中发现许多假定的阳离子转运蛋白，这些阳离子转运蛋白有利于道南电势的形成。阳离子泵在电势梯度的产生和维持方面有重要作用。细胞内部正电势梯度有利于维持胞内外 pH 平衡。一旦嗜酸菌胞内泵出 H^+的能力降低，环境中的大量 H^+就会涌入细胞内。这样就会在一定程度上导致嗜酸菌体内的$\Delta\psi$迅速升高，反向的ΔpH 与迅速升高的$\Delta\psi$相互抵消，从而抑制 H^+的流入。

2.3 生物大分子的修复

嗜酸菌在极端酸性环境下生存，需要保持体内 DNA 和蛋白结构的稳定，并发挥活性。生物大分子由于酸性环境的破坏需要得到及时地修复，在很多嗜酸菌中发现了丰富的 DNA 和蛋白质修复基因。Fütterer 等[24]发现 *P. torridus* 含有基因编码许多修复和重组蛋白，比如 RadA 、RadB 、MRE11 和 Rad50 在酸性环境下 DNA 修复过程中起到作用。细胞质膜上存在许多蛋白质，主要参与生物能和底物进出细胞的运输。内膜蛋白在周质的区域最容易受外环境 pH 的影响，周质空间中存在着酸性条件下能帮助周质蛋白和膜蛋白复性的分子伴侣 HdeA 和 HdeB。HdeA 单体能够和变性的底物蛋白结合防止它们酸诱导聚集，其他的周质分子伴侣 DegP 和 SurA 协助周质蛋白重折叠[26]。在一些嗜酸菌中，分子伴侣可以修复错误折叠的蛋白质。在外环境遭遇酸胁迫时，由 DnaK、DnaJ 以及 GrpE 组成的伴侣蛋白抗逆体系，可在 ATP 的协助下发挥其纠错功能机制。当外部环境 pH 降低时，研究发现 *At. thiooxidans* ZJJN-3 核心的修复分子伴侣 GrpE、DnaK、DnaJ 转录水平上调，从而确保在酸胁迫下蛋白的正确折叠 [9]。

嗜酸菌细胞质内部区室化，存在 pH 梯度。专性嗜酸菌 *Ferroplasma acidiphilum* 的胞内 pH 为 5.6，但是相应的酶在更低的 pH（1.7-4.0）下才能发挥作用。蛋白表面疏水性氨基酸残基的增加有利于增强蛋白的耐酸性[27]。*F. acidiphilum* 特有的铁蛋白有利于维持酶在低 pH 下的稳定性。去除铁离子导致二级结构缺失，从而引起蛋白活性消失[28]。这说明铁离子对保持蛋白三维结构起到

重要作用。硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）的β内切葡聚糖酶在 pH 为 1.8 时仍保持活性，结构模拟发现与其他嗜酸菌或中性菌的纤维素酶催化结构域相似，所以在高浓度的氢离子条件下，依然可以进行正常的代谢反应[29]。

2.4 胞内缓冲作用

胞内缓冲系统也对维持嗜酸菌 pH 内环境的稳定起到重要的作用。机体内许多重要的分子都是弱酸或弱碱，比如赖氨酸，组氨酸，精氨酸和磷酸等。它们在生物系统中形成重要的共轭酸碱对，可以起到胞内 pH 缓冲作用。绝大多数有机酸在细胞质中的 pK’和浓度相对太低，因此在胞内起到缓冲作用的主要还是 HPO_4^{2-}/H_2PO^{4-}和 HCO^{3-}/CO_2 缓冲体系。

嗜酸菌通过 F_1-F_0-ATPase 泵入大量 H^+产生 ATP。随着大量 H^+的涌入，体内 pH 达到胞质 pH 下限，这时细胞质就会发挥自身缓冲能力，以缓解酸性变化带给自身的影响。研究发现酸热芽孢杆菌（*Bacillus acidocaldarius*）的缓冲能力并不比其他测试的杆菌强[30]。这说明嗜酸菌虽然可以通过胞内缓冲作用起到 pH 平衡的作用，但其效率可能并不高于中性菌。Ullrich 等发现极端嗜酸菌“*Ferrovum*”[31]和“*Ferrovum*” *sp.* JA12[32]分别通过胞内氨基酸脱羧和脲酶水解尿素生成氨，从而起到胞内 pH 缓冲作用。

2.5 其他的一些耐酸机制

嗜酸菌细胞壁外包围的荚膜对 H^+也有一定的抑制作用，但荚膜不能耐受极端酸性，当环境 pH<0.8 时不起作用[33]。相比嗜中性菌，嗜酸菌细胞膜上的二次转运蛋白比例较高，比如 *P. torridus* 和 *T. acidophilum* 的二次转运蛋白占比分别达到 10:1 和 5.6:1[24]。细胞膜上丰富的二次转运蛋白在嗜酸菌耐酸代谢方面可能有着重要的作用。由于二次转运蛋白，嗜酸细菌可以利用质子推动力代谢产能，从而获得在酸性环境中生存需要的大量 ATP。几乎所有的专性嗜酸菌的基因组都很小，比如热原体 DNA 中的碱基约为 1100kb。基因组的大小与嗜酸菌在酸性条件下生存可能有一定的联系[34]。嗜酸菌的密码子通常含有较高的嘌呤。因为嘌呤可以形成三个氢键，而嘧啶只能形成两个，所以嘌呤比嘧啶在高温下更难降解。但是嘌呤在酸性条件下更易水解，所以减少密码子中嘌呤的含量，有助于发现与酸水解相关的突变菌株[35]。

3 工业微生物耐酸工程菌的改造

在工业上运用中性菌株发酵生产乳制品、食用酸、细菌素等过程中，常常伴有乳酸、醋酸、丙酸等酸性代谢产物的形成，这些酸性物质的积累降低了发酵环境的 pH。发酵环境的酸化严重限制了中性菌株的正常生长，从而影响目标产物的产量[36]。目前国内外对工业微生物酸胁迫改造途径的研究已取得很多重要成果。除了自然耐酸工业菌株的筛选，通过基因工程、代谢工程等技术增强工业微生物耐酸能力也得到了快速的发展。

益生菌是一类对宿主有益的活性微生物，通常生活在肠道中，具有耐酸、耐高温的特点。考虑到全球日益严重的微生物耐药性，国内外很多研究另辟蹊径，利用益生菌为口服给药的生物载体，治疗人体相关疾病[37]。口服胰岛素制剂一直是生物医学工程的难点，因为胰岛素直接口服经过胃会被其中的蛋白酶消化。Feng 等[38]利用人胰岛素原作为外源基因构建重组质粒 pJS700-HPI，并导入到枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）中。重组枯草芽孢杆菌口服制剂经肠道消化吸收后在体内增殖，胰岛素原也同时得到表达。

在利用乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*）生产乳酸链球菌素（Nisin）的过程中，发酵液的酸化虽然有利于保持 nisin 的活性，却不利于乳酸乳球菌的生长，从而降低 nisin 的产量[39]。本实验室从导入不同的耐酸基因、细胞壁的固化重塑以及 sRNA 耐酸代谢调控等方面，围绕 *Lactococcus lactis* 的耐酸机理，构建耐酸能力强的 *Lactococcus lactis* 菌株。Zhang 等[40]通过向原始菌株 F44 中导入 *hdeAB*, *ldh* 和 *murG* 等不同耐酸基因，构建出一株耐酸工程菌株 ABGL。ABGL 可以在 pH4.2 的酸性平板上生长，相较原始菌株 F44，降低了 0.4 个 pH 梯度。ABGL 工程菌株 nisin 产量达到 5563 IU/mL，相较原始菌株 F44，增加了 2753IU/mL。Hao 等[41]首次发现 D-Asp 酰胺化相关的基因 *asnH* 与耐酸之间的关系，并通过细胞壁重塑增强乳酸乳球菌的耐酸能力。与野生型菌株相比，过表达 *asnH* 菌株 F44A 的耐酸能力增强 7 倍，同时 Nisin 产量增加 57.0%，达到 5346IU/mL。构建的耐酸工程菌株 F44A 肽聚糖交联度增加 5.1%，这有利于保持肽聚糖的完整性，从而抑制胞外 H^+流入，维持细胞内 pH 的稳定。sRNA 可以通过调控 yedP、RpoS 以及 GadX 等一些酸耐受相关蛋白的表达，起到调节微生物耐酸性的作用[42]。Qi 等[43]通过 RNA 测序，qRT-PCR 以及 Northern 印迹等方法，在乳酸乳球菌 F44 中鉴定出新型 sRNA *s015*，发现 *AtpG*，*busAB*，*cysD*，*ilvB*，*tcsR*，*ung*，*yudD* 和 *ywdA* 为 *s015* 的直接靶标，并阐明了 *s015* 与其靶基因之间的相互作用。通过人工设计 sRNA 并导入 F44 菌株中，构建新的乳酸乳球菌耐酸工程菌，实现在酸性环境下高产 nisin 的目的。

对于会产生大量有机酸的微生物而言，对酸的耐受性是必需的。醋酸细菌（acetic acid bacterium，AAB）对酸性环境具有较强的耐受性，大部分菌株能够在 pH<5 的环境中生长很好。在已发现的醋酸菌中，不同种类的醋酸菌对酸的耐受性有很大的差异，其主要的耐酸分子机制可归纳为细胞包被结构的修饰、依赖 PMF 的醋酸外排系统以及三羧酸循环中的某些酶、应激蛋白的作用等[44]。在食醋工业的发酵生产中，醋酸菌的耐酸性具有重要的意义。应对醋酸耐受需要消耗大量的 ATP，所以充足的能量供应是醋酸菌在酸化环境中进行食醋发酵的重要保障[45]。因此，构建出具有高强度耐酸和产酸速率快的醋酸工程菌株并应用于食醋发酵的生产，将极大地推动新型低能耗液态酿醋工业的发展。

嗜酸菌的耐酸性与其自身的细胞结构以及细胞膜和细胞质中的各种酶的含量有着密切的联系，其亚细胞结构和代谢途径可能有着特定的 pH 平衡机制。生活在极端酸性环境中的嗜酸菌在其基因上有着一定的特殊性，某些特定的基因片段上存在着调控其耐酸机制的序列。基于嗜酸菌耐酸机制的生物信息学预测和极端酸性环境下嗜酸菌宏基因组技术耐酸功能基因的获取，利用系统生物学和合成生物学的方法从嗜酸菌中获得适宜的耐酸模块，并整合到工业微生物的耐酸代谢网络中，从整体水平对工业微生物耐酸能力进行系统改造，或许可以显著提高工业微生物的耐酸能力。

4 结论与展望

虽然嗜酸菌的耐酸机制在分子水平得到了一定的解释，但在逆膜电势、膜通道蛋白、质子泵、酸稳定性酶以及大分子修复系统等方面与中性耐酸菌的差异仍需要进一步研究。采用高通量测序技术和蛋白质组技术，发展结构生物学及计算生物学的方法有利于我们获得更多的嗜酸菌耐酸生理机制。在各种组学及其相应的耐酸代谢网络研究相对成熟的基础上，从嗜酸菌中获取相关酸胁迫调控元件和耐酸功能组件，并运用到工业微生物耐酸研究中，可以充分发挥其科学价值和经济价值。

参考文献

[1] Sharma A, Kawarabayasi Y, Satyanarayana T. Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications[J]. Extremophiles, 2012, 16(1): 1-19

[2] Dhakar K, Pandey A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100(6): 2499-2510

[3] Krulwich T A, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(5): 330-343

[4] 徐自祥,郑平,孙际宾. 全细胞网络重建与细胞工厂设计[J]. 生物化学与生物物理进展,2014,(02):105-114

Xu Z X, Zheng P, Sun J B. Reconstruction of Whole Cell Network and Design of Cell Factory [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(2): 105-114

[5] Nielsen A A K, Der B S, Shin J, et al. Genetic circuit design automation[J]. Science, 2016, 352(6281): aac7341

[6] Liu Y, Tang H, Lin Z, et al. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation[J]. Biotechnology advances, 2015, 33(7): 1484-1492

[7] Lund P, Tramonti A, De Biase D. Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria[J]. FEMS microbiology reviews, 2014, 38(6): 1091-1125

[8] Pandey R, Vischer N O E, Smelt J P P M, et al. Intracellular pH response to weak acid stress in individual vegetative Bacillus subtilis cells[J]. Applied and environmental microbiology, 2016, 82(21): 6463-6471

[9] Feng S, Yang H, Wang W. System-level understanding of the potential acid-tolerance components of Acidithiobacillus thiooxidans ZJJN-3 under extreme acid stress[J]. Extremophiles, 2015, 19(5): 1029-1039

[10] Feyhl-Buska J, Chen Y, Jia C, et al. Influence of Growth Phase, pH, and Temperature on the Abundance and Composition of Tetraether Lipids in the ThermoacidophilePicrophilus torridus[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(62):1-5

[11] Sperelakis N. Cell physiology source book: essentials of membrane biophysics[M]. Elsevier, 2012:303-321

[12] Villanueva L, Damste J S S, Schouten S. A re-evaluation of the archaeal membrane lipid biosynthetic pathway[J]. Nature reviews. Microbiology, 2014, 12(6): 438
[13] Siliakus M F, Oost J V D, Kengen S W M. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure[J]. Extremophiles, 2017, 21(4):1-20
[14] Mangold S, Rao Jonna V, Dopson M. Response of Acidithiobacillus caldus toward suboptimal pH conditions[J]. Extremophiles, 2013, 17(4): 689-696
[15] Oger P M, Cario A. Adaptation of the membrane in Archaea[J]. Biophysical Chemistry, 2013, 183(24):42
[16] Méndezgarcía C, Peláez A I, Mesa V, et al. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats.[J]. Front Microbiol, 2015, 6(475):475
[17] Shimada H, Nemoto N, Shida Y, et al. Effects of pH and temperature on the composition of polar lipids in Thermoplasma acidophilum HO-62[J]. Journal of bacteriology, 2008, 190(15): 5404-5411
[18] Mykytczuk N C S, Trevors J T, Ferroni G D, et al. Cytoplasmic membrane fluidity and fatty acid composition of Acidithiobacillus ferrooxidans in response to pH stress[J]. Extremophiles, 2010, 14(5): 427-441
[19] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment[J]. Nature, 2004, 428(6978): 37-43
[20] Keffeler E C, Payne S, Blum P. The Energetic Cost of Improved Acid Resistance[J]. The FASEB Journal, 2016, 30(1 Supplement): 838.4-838.4
[21] Ferguson S J, Ingledew W J. Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. Acidithiobacillus ferrooxidans as a paradigm[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2008, 1777(12): 1471-1479
[22] Acuña L G, Cárdenas J P, Covarrubias P C, et al. Architecture and gene repertoire of the flexible genome of the extreme acidophile Acidithiobacillus caldus[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78237
[23] Quatrini R, Lefimil C, Veloso F A, et al. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans[J]. Nucleic acids research, 2007, 35(7): 2153-2166
[24] Fütterer O, Angelov A, Liesegang H, et al. Genome sequence of Picrophilus torridus and its implications for life around pH 0[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(24): 9091-9096
[25] Buetti-Dinh A, Dethlefsen O, Friedman R, et al. Transcriptomic analysis reveals how a lack of potassium ions increases Sulfolobus acidocaldarius sensitivity to pH changes[J]. Microbiology, 2016, 162(8): 1422-1434
[26] 周丹丹,于延庆,吴昊,等. 分子伴侣 HdeA 与底物蛋白 SurA 作用机制的模拟研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2017,(03):242-252

Zhou D D, Yu Y Q, Wu H, et al. Simulation study on the mechanism of molecular chaperone HdeA and SurA [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2017, 44(3): 242-252
[27] Golyshina O V, Tran H, Reva O N, et al. Metabolic and evolutionary patterns in the extremely acidophilic archaeon Ferroplasma acidiphilum Y(T)[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):3682
[28] Ferrer M, Golyshina O V, Beloqui A, et al. The cellular machinery of Ferroplasma acidiphilum is iron-protein-dominated[J]. Nature, 2007, 445(7123): 91-94
[29] Bhalla A, Bansal N, Kumar S, et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes[J]. Bioresource Technology, 2013, 128(1):751-759
[30] Slonczewski J L, Fujisawa M, Dopson M, et al. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea[J]. Advances in microbial physiology, 2009, 55: 1-317

[31] Ullrich S R, González C, Poehlein A, et al. Gene Loss and Horizontal Gene Transfer Contributed to the

Genome Evolution of the Extreme Acidophile "Ferrovum"[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(390):797

[32] Ullrich S R, Poehlein A, Tischler J S, et al. Genome Analysis of the Biotechnologically Relevant Acidophilic Iron Oxidising Strain JA12 Indicates Phylogenetic and Metabolic Diversity within the Novel Genus "Ferrovum".[J]. Plos One, 2016, 11(1):1725-35

[33] Li X, Kappler U, Jiang G, et al. The ecology of acidophilic microorganisms in the corroding concrete sewer environment[J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8

[34] van Wolferen M, Ajon M, Driessen A J M, et al. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions[J]. Extremophiles, 2013, 17(4): 545-563

[35] Prabha R, Singh D P, Gupta S K, et al. Comparative analysis to identify determinants of changing life style in Thermosynechococcus elongatus BP-1, a thermophilic cyanobacterium[J]. Bioinformation, 2013, 9(6): 299

[36] 郝小明,陈博,安泰. 工业微生物酸胁迫的耐受机制及改造途径[J]. 生物工程学报,2015,(08):1151-1161

Hao X M, Chen B, An T. Pathway modification of industrial microorganisms to improve acid-stress tolerance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015,(08):1151-1161

[37] Zhang B, Li A, Zuo F, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 secretes a bioactive kisspeptin that inhibits proliferation and migration of human colon carcinoma HT-29 cells [J]. Microbial cell factories, 2016, 15(1): 102-113

[38] Feng F, Hu P, Chen L, et al. Display of human proinsulin on the Bacillus subtilis spore surface for oral administration[J]. Current microbiology, 2013, 67(1): 1-8

[39] Zhang Y F, Liu S Y, Du Y H, et al. Genome shuffling of Lactococcus lactis subspecies lactis YF11 for improving nisin Z production and comparative analysis[J]. Journal of dairy science, 2014, 97(5): 2528-2541

[40] Zhang J, Caiyin Q, Feng W, et al. Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability ofLactococcus lactisF44[J]. Scientific Reports, 2016, 6:27973

[41] Hao P, Liang D, Cao L, et al. Promoting acid resistance and nisin yield of Lactococcus lactis, F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(15):6137-6153

[42] 赵秀丽,周丹丹,闫晓光,等. 细菌小 RNA 的调控及在代谢工程中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2017,(06):97-106

Zhao X L, Zhou D D, Yan X G, et al. Regulation and application in metabolic engineering of bacterial small RNAs[J]. China Biotechnology, 2017, (06):97-106

[43] Qi J, Caiyin Q, Wu H, et al. The novel sRNA s015 improves nisin yield by increasing acid tolerance of Lactococcus lactis F44[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(16): 6483-6493

[44] Wang B, Shao Y, Chen F. Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(2): 255-263

[45] 夏凯,朱军莉,梁新乐. 醋酸菌耐酸机理及其群体感应研究新进展[J]. 微生物学报,2017,(03):321-332

Xia K, Zhu J L, Liang X L. Advances in acid resistant mechanism of acetic acid bacteria and related quorum sensing system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, (03):321-332

Mechanism of Acid Tolerance in Acidophiles with pH Homeostasis and its Potential Applications

ZHANG Yue-ming QIAO Jian-jun

（Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University；
Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education；Syn Bio Research Platform,
Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China）

Abstract： Acidophiles can survive in the extremely acidic environment and are most widely distributed in the bacterial and archaeal domains. They play an important role in the bioremediation and source of thermostable and acid-tolerant enzyme. Some neutral engineering strains often encountered the problem of acidification in the process of fermentation. Considering unique acid-tolerant ability of the acidophiles, if we can get acid-tolerant module from the acidophiles and applied to the neutral engineering strains, perhaps we can build acid-tolerant engineering strains. Therefore, the article overviews the common mechanisms for acid tolerance in acidophiles, including cell membrane stability and low permeability, energetic metabolism with acid tolerance, repair or protection of macromolecules and cytoplasmic buffering, with a view to make some contributions for synthetic biology of acid-tolerant engineering strains.

Key words： Acidophiles Acid-tolerant module pH homeostasis Synthetic biology